

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
20. Dezember 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/96286 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07C 257/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/06789

(22) Internationales Anmeldedatum:
15. Juni 2001 (15.06.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 29 014.0 15. Juni 2000 (15.06.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): FRIEDRICH-SCHILLER- UNIVERSITÄT
JENA [DE/DE]; Fürstengraben 1, 07743 Jena (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): STÜRZEBECHER,
Jörg [DE/DE]; Hubertusstrasse 38, 99094 Erfurt (DE).
STEINMETZER, Torsten [DE/DE]; Ricarda-Huch-Weg
23, 07743 Jena (DE). KÜNZEL, Sebastian [DE/DE];
St.-Jakob-Strasse 6, 07743 Jena (DE). SCHWEINITZ,
Andrea [DE/DE]; Gustav-Fischer-Strasse 15, 07745 Jena
(DE).

(74) Anwälte: BOCK, Gerhard usw.; Pfeiffer & Partner,
Winzerlaer Strasse 10, 07745 Jena (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO,
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- insgesamt in elektronischer Form (mit Ausnahme des Kopf-
bogens); auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: UROKINASE INHIBITORS

(54) Bezeichnung: UROKINASE-HEMMSTOFFE

(57) Abstract: The invention relates to a highly active, highly specific urokinase inhibitor which is suitable for therapeutic applications and can be synthesized in an extremely simple manner. Surprisingly, it was found that amidino benzylamine derivatives, especially 4-amidino-benzylamine, with two bonded amino acids represent a new group of highly active and very selective uPA inhibitors. The urokinase inhibitors can be used in medical applications, e.g. in the treatment of malign tumours such as in cases of metastatic spread.

(57) Zusammenfassung: Es soll ein auch für therapeutische Anwendungen geeigneter Wirkstoff angegeben werden, der Urokinase mit hoher Aktivität und Spezifität hemmt und der mit möglichst geringem Synthesaufwand herstellbar ist. Überraschend wurde gefunden, dass Derivate des Amidinobenzylamins, insbesondere des 4-Amidino-benzylamins, mit zwei gebundenen Aminosäuren eine neue Gruppe von hochaktiven und sehr selektiven uPA-Hemmstoffen darstellen. Die Urokinase-Hemmstoffe werden für medizinische Anwendungen, beispielsweise zur Behandlung von malignen Tumoren sowie der Metastasierung, eingesetzt.

WO 01/96286 A2

Urokinase-Hemmstoffe

Beschreibung

5 Die Erfindung betrifft neue Hemmstoffe der Urokinase zur Behandlung von malignen Tumoren und der Metastasierung.

Die Ausbreitung und Metastasierung solider Tumoren in umgebendem Gewebe wird durch ihre Fähigkeit, die extrazelluläre Matrix in der Umgebung der Tumorzelle abzubauen bzw. die Basalmembran zu
10 durchdringen, ermöglicht. In diesem Prozess kommt neben verschiedenen Matrixmetalloproteinasen und Cathepsinen vor allem dem Plasminogenaktivator Urokinase (uPA) eine zentrale Bedeutung zu (P. Mignatti und D.B. Rifkin, *Physiol. Rev.* 73, 161-195, 1993). So bewirkt uPA die Aktivierung von Plasminogen; das entstehende Plasmin kann die
15 Komponenten der extrazellulären Matrix (Fibrin, Fibronectin, Laminin, Proteoglykane u.a.) abbauen sowie Metalloproteasen und pro-Urokinase zu uPA aktivieren (U. Reuning et al., *Int. J. Oncol.* 13, 893-906, 1998).

Sowohl pro-Urokinase als auch uPA binden an den uPA-Rezeptor (uPAR), einen an der Zelloberfläche lokalisierten, spezifischen Rezeptor.
20 Dadurch wird eine Verstärkung und Fokussierung der Aktivität von uPA und damit der Plasminogenaktivierung in der direkten Umgebung der Tumorzelle erreicht. Sowohl in zellbiologischen Studien als auch in Tiermodellen konnte die Bedeutung dieses zellassozierten Plasminogenaktivator-Systems für Tumorwachstum und -ausbreitung
25 gezeigt werden. So wird das invasive Potential von Tumorzellen bei Hemmung der enzymatischen Aktivität von uPA durch die natürlichen Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 herabgesetzt (J.-F. Cajot et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6939-6943, 1990; M. Baker et al., *Cancer Res.* 50, 4876-4684, 1990). In Hühnerembryos konnte durch Zugabe von
30 Antikörpern gegen uPA die durch menschliche Karzinomzellen verursachte Bildung von Lungenmetastasen fast vollständig verhindert werden (L. Ossowski et al., *Cell* 35, 611-619, 1983).

Die Faktoren des Plasminogenaktivator-Systems (uPA, uPAR, PAI-1 und PAI-2) sind in den letzten Jahren in Hinsicht ihrer klinischen
35 Relevanz für die Prognose von Patienten mit soliden malignen Tumoren intensiv untersucht worden. Insbesondere der Gehalt von uPA im

Gewebe verschiedener Tumoren erwies sich als ein Prognosefaktor. So haben Patienten mit hohem uPA-Spiegel eine schlechtere Prognose als solche mit niedriger uPA-Konzentration im Tumor (M. Schmitt et al., Thromb. Haemost. 78, 285-296, 1997; R.W. Stephens et al., Breast Cancer Res. Treat. 52, 99-111, 1998). Auch eine erhöhte Konzentrationen an uPAR im Tumorgewebe korreliert mit einer schlechten Prognose (H. Pedersen et al., Cancer Res. 54, 4671-4675, 1994; C. Duggan et al., Int. J. Cancer 61, 597-600, 1995).

Aus den Befunden zum prognostischen Wert des uPA- und uPAR-Gehaltes im Tumorgewebe kann angenommen werden, dass synthetische uPA-Inhibitoren in der Lage sind, Invasion und Ausbreitung von Tumorzellen zu unterdrücken. Die Zahl der bisher bekannten uPA-Hemmstoffe ist allerdings relativ klein. Die Mehrzahl besitzt nur eine geringe Spezifität und Wirkungsstärke, wie es für verschiedene Benzamidin- und β -Naphthamidin-Derivate zutrifft (J. Stürzebecher und F. Markwardt, Pharmazie 33, 599-602, 1978). Das von Vassalli und Belin (FEBS Letters 214, 187-191, 1997) als uPA-Hemmstoff beschriebene Amilorid ist zwar ein spezifischer, aber schwacher Inhibitor von uPA ($K_i = 7 \mu\text{M}$).

Stärker wirksame uPA-Inhibitoren wurden mit 4-substituierten Benzothiophen-2-carboxamidinen ($K_i = 0,16 \mu\text{M}$ für Verbindung 623) gefunden. Hemmstoffe dieses Typs inaktivieren auch uPA, die an uPAR gebunden ist (M.J. Towle et al., Cancer Res. 53, 2553-2559, 1993). Die Benzothiophen-Derivate sind sehr spezifisch, ihre Hemmwirkung gegenüber Plasmin und dem Plasminogenaktivator vom Gewebetyp (tPA) ist gering, allerdings ist die Synthese von Verbindungen dieses Typs sehr aufwändig.

Eine vergleichbare Spezifität haben auch 4-Aminomethylphenylguanidin-Derivate, deren Hemmwirkung gegenüber uPA ($K_i = 2,4 \mu\text{M}$ für die wirksamste Verbindung) allerdings vergleichsweise gering ist (S. Sperl et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 5113-5118, 2000).

Im Gegensatz dazu erreichen α -Triisopropylphenylsulfonyl-3-amidinophenylalanin-Derivate mikromolare K_i -Werte ($0,41 \mu\text{M}$ für die wirksamste Verbindung), sind allerdings sehr unspezifische uPA-Hemmstoffe, mit gleicher oder stärkerer Wirkung werden Trypsin, Thrombin und Plasmin inhibiert (J. Stürzebecher et al., Bioorg. Med.

Letters 9, 3147-3152, 1999). Sehr wirksame uPA-Hemmstoffe sind in der WO 99/05096 mit weiterentwickelten β -Naphthamidinen offenbart. Es werden IC_{50} -Werte im nanomolaren Bereich beschrieben, allerdings keine Angaben zur Selektivität und der biologischen Wirksamkeit gemacht.

Bisher wurden nur wenige Peptide als uPA-Hemmstoffe beschrieben, die sich von der Substrat-Sequenz ableiten. Kettner und Shaw (Methods in Enzymology, 80, 826-842, 1981) beschrieben Chlormethylketone, die zwar uPA irreversibel hemmen, aber nicht für in vivo-Anwendung geeignet sind.

In der EP 18 32 71 sind Lysin-Derivate offenbart, die eine gewisse uPA-Hemmung bewirken, allerdings auch andere vergleichbare Enzyme hemmen und damit nur sehr speziell bzw. eingeschränkt für medizinische Zwecke verwendbar sind. Gleiches gilt für die in der WO 95/17 8 85 als uPA-Inhibitoren beschriebenen niedermolekularen Polypeptide (ca. 50 Aminosäuren), die sich von natürlichen Hemmstoffen ableiten. Auf Grund ihres Peptidcharakters und der Molekülgröße ist ihr in vivo-Einsatz stark eingeschränkt.

In jüngster Zeit wurden allerdings in WO 00/05 2 45 Peptidylaldehyde mitgeteilt, die C-terminal ein Argin und in P3 ein D-Serin enthielten und uPA wirksam hemmten. Jedoch bedingt die Aldehydfunktion Instabilität und eine geringe Selektivität. Nach Acylierung des Ser-Hydroxyl konnte für die Leitverbindung $iBuOCO-D-Ser-Ala-Arg-H$ nach s.c.-Gabe eine relative Bioverfügbarkeit von 87 % beobachtet werden (S. Y. Tamura et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 10, 983-987, 2000).

Ferner wurden bei der Suche nach Hemmstoffen des Thrombins, einem mit uPA verwandten Enzym, mit Tripeptid-Derivaten vom D-Phe-Pro-Arg-Typ sowohl in Hinblick auf Hemmwirkung als auch Bioverfügbarkeit bemerkenswerte Fortschritte erzielt; wenn C-terminal Agmatin, trans-4-Aminomethyl-cyclohexylamin oder 4-Amidino-benzylamin eingebaut wurde. Es wurden picomolare K_i -Werte erreicht und die orale Bioverfügbarkeit verbessert (T.J. Tucker et al., J. Med. Chem. 40, 1565-1569 und 3687-3693, 1997); allerdings wurden keine uPA-Hemmstoffe gefunden. So hemmt Melagatran, das C-terminal einen 4-Amidino-benzylamid-Rest besitzt, Trypsin ($K_i = 4,0$ nM) und Thrombin ($K_i = 2,0$ nM) sehr unspezifisch, während die Hemmung von

uPA mit einem $K_i = 6,3 \mu\text{M}$ drei Größenordnungen schwächer ist (D. Gustafsson et al., Blood Coagul. Fibrinolysis 7, 69-79, 1996; WO 94/29336).

- 5 Der Erfindung liegt die Aufgabe zu Grunde, einen auch für therapeutische Anwendungen geeigneten Wirkstoff anzugeben, der Urokinase mit hoher Aktivität und Spezifität hemmt und der mit möglichst geringem Syntheseaufwand herstellbar ist.
- 10 Überraschend wurde gefunden, dass acyliertes Amidino-benzylamin gemäß der im Patentanspruch 1 angeführten allgemeinen Formel I, insbesondere Verbindungen des 4-Amidino-benzylamins, bei denen X , R_1 , R_2 und R_3 natürliche und/oder unnatürliche Aminosäuren ergeben, Urokinase sehr wirksam und selektiv hemmen. Einen besonders aktiven
- 15 Urokinase-Hemmstoff bildet dabei Amidino-benzylamin, wenn die Amidinogruppe in 4-Position steht, als Aminosäuren Gly und D-Ser gebunden sind und wenn die Verbindung eine N-terminale Schutzgruppe R_4 aus einem Aryl- bzw. Aralkyl-sufonyl-Rest aufweist.
- 20 Ester, insbesondere solche mit Oxycarbonsäuren, können als Prodrug eingesetzt werden, wenn sie im Verlauf der enteralen Aufnahme hydrolysiert werden. Es wurde auch überraschend gefunden, dass einige dieser Oxycarbonyl-Derivate der erfindungsgemäßen Verbindungen ebenfalls sehr starke Urokinase-Hemmstoffe sind.
- 25 Neben Urokinase wurden durch die Glycin-Derivate andere Enzyme deutlich weniger gehemmt, so dass diese erfindungsgemäßen Derivate des Amidino-benzylamins eine neue Gruppe von hochaktiven und sehr selektiven uPA-Hemmstoffen darstellen. Im Gegensatz dazu hemmen Verbindungen, die als R_1 kein H tragen, (z. B. Alanin-Derivate) Urokinase nicht mehr selektiv, sondern sind auch starke Hemmstoffe von Trypsin,
- 30 Thrombin und Plasmin.
- Die Verbindungen liegen in der Regel als Salze mit Mineralsäuren, bevorzugt als Hydrochloride, vor oder als Salze mit geeigneten organischen Säuren.

- 5. -

Die Verbindungen der allgemeinen Formel I können, wie nachfolgend beschrieben, nach bekannten Verfahren auf relativ einfache Weise hergestellt werden:

Die Ausgangsverbindung 4-Cyanobenzylamin wird über Gabrielsynthese (G. Wagner und I. Wunderlich, Pharmazie 32, 76-77, 1977; B.C. Bookser und T.C. Bruice, J. Am. Chem. Soc. 113, 4208-4218, 1991) aus 4-Cyanobenzylbromid hergestellt. Aus dem so hergestellten 4-Cyanobenzylamin wird das Boc-geschützte Acetyloxamidino-benzylamin gewonnen. Die Ankopplung der weiteren Aminosäuren und der Schutzgruppe R₄ erfolgt mittels Standardkopplungsmethoden mit Boc als N-terminale Schutzgruppe. Die zweite Aminosäure kann auch direkt als N-aryl- bzw. N-aralkyl-sulfonyl-geschützte Aminosäure gekoppelt werden. Die Peptidanaloga werden sequentiell, beginnend vom Acetyloxamidino-benzylamin, aufgebaut. Zur Synthese der entsprechenden Ester wird die Zielverbindung mit dem entsprechenden Säurechlorid umgesetzt. Die meisten Produkte kristallisierten gut und lassen sich damit einfach reinigen. Die Reinigung der Hemmstoffe erfolgt in der letzten Stufe über präparative, reversed-phase HPLC.

Die Erfindung soll nachstehend anhand von zwei Ausführungsbeispielen näher erläutert werden:

Ausführungsbeispiel 1:

Synthese von Benzylsulfonyl-D-Ser-Gly-4-Amidino-benzylamid x HCl

1.1 Boc-4-Cyano-benzylamid

20 g (0,151 mol) 4-Cyano-benzylamin wurden in 300 ml H₂O, 150 ml Dioxan und 150 ml 1 N NaOH gelöst. Unter Eiskühlung wurden 37,5 ml Di-tert.-butyl-dicarbonat zugetropft und eine Stunde bei 0 °C sowie weitere 24 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Das Dioxan wurde im i.V. entfernt und der wässrige Rückstand 3-mal mit Essigester extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden 3-mal mit 5 %-iger KHSO₄- und 3-mal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und i.V. eingeeengt (weiße Kristalle). HPLC: Acetonitril/H₂O, Elution bei 44,1 % Acetonitril; Ausbeute: 30,48 g (0,131 mol), 87 %.